

Trabalho de Conclusão de Curso

**Análise morfohistométrica do padrão de
formação óssea utilizando membranas de
poliácido lático-co-glicólico (PLGA)
associado ou não à hidroxiapatita em calota
craniana de ratos**

Suzeli Dias



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Suzeli Dias

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO PADRÃO DE FORMAÇÃO
ÓSSEA UTILIZANDO MEMBRANAS DE POLIÁCIDO LÁTICO-
CO-GLICÓLICO (PLGA) ASSOCIADO OU NÃO À
HIDROXIAPATITA EM CALOTA CRANIANA DE RATOS**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso de
Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza
Magini

Co-orientador: Prof. Dr. Àguedo
Aragones

Florianópolis
2014

Suzeli Dias

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO PADRÃO DE FORMAÇÃO
ÓSSEA UTILIZANDO MEMBRANAS DE ÁCIDO POLILÁTICO-
CO-GLICÓLICO (PLGA) ASSOCIADO OU NÃO À
HIDROXIAPATITA (PLGA + HA) EM CALOTA CRAIANA DE
RATOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 14 de novembro de 2014.

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Ricardo de Souza Magini,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Mário Vinícius Zendron,
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dra. Ariadne Cruz
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Ms. Cléssius Xavier
Suplente
Universidade Federal de Santa Catarina

DEDICATÓRIA

*À minha Mãe, mulher da minha vida.
Que muitas vezes abriu mão dos seus
sonhos para que eu pudesse realizar os
meus. Pelo seu exemplo de humildade e
simplicidade. Seu apoio, zelo e incentivo
foram o que me deram nos momentos
difíceis esperança para seguir. És meu
símbolo de Amor maior e eterno.*

AGRADECIMENTOS

Posso dizer que o desenvolvimento deste trabalho simboliza não apenas o resultado de uma pesquisa científica, como também um momento de reflexão e percepção retrospectiva da minha vida nestes últimos anos de dedicação a construção dessa maravilhosa profissão que me ponho a seguir a partir de então, e que tenho muito a lapidar.

Esta etapa da vida não significa somente o fim de uma jornada, mas sim o início de tantas outras que já aspiro. Durante esta breve caminhada da minha rotina acadêmica tive o privilégio de conhecer grandes Mestres e grandes Amigos que se somaram ao meu intuito de aperfeiçoamento no âmbito profissional e pessoal e me proporcionam hoje muita gratidão e carinho.

Quero agradecer a todos que marcaram minha vida durante esta fase, certamente os levarei comigo tatuadas em meu coração.

Agradeço primeiramente a ***Deus*** pela dádiva da vida e por ter me colocado nos lugares certos nos momentos ideais.

Aos meus pais, ***Jairo José Dias e Marlete Teixeira Dias***, amores da minha vida, pelo apoio, amor e confiança em mim depositada. Além de serem meu porto seguro.

À minha irmã, ***Suelen Dias***, por estar presente em todos os momentos da minha vida, pelo zelo e carinho desde criança. Certamente ter você como irmã é um presente divino.

Aos meus tios, ***Fernando Ruzza e Janete Dias Ruzza***, por todo apoio e incentivo em todos os momentos, principalmente nos primeiros passos desta caminhada.

Ao meu namorado, **Bruno Seemann Vieira**, pelo seu amor e carinho. Seu incentivo, confiança e apoio integral foram às peças-chaves para eu estar aqui hoje. És exemplo de ética e sabedoria. Espelho-me em você na busca da perfeição. Admiro-te muito profissionalmente.

Ao meu cunhado, **João Henrique Dobler Lima**, pelo apoio nas horas que eu mais precisei, certamente jamais esquecerei. Sou extremamente grata a tudo, admiro muito a sua inteligência.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, pelo seu talento ímpar na Odontologia e talento de nos transmitir sua experiência, pelas oportunidades, pelo apoio e pela confiança. Seu talento e sabedoria são minha inspiração para superação e aperfeiçoamento diário.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Águedo Aragones**, por se mostrar sempre disposto a ajudar com dificuldades que surgiram durante a realização deste trabalho.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal, **Prof^{ra}. Dra. Elena Riet Correa Rivero**, **Prof^{ra}. Dra. Professora Liliane Janete Grando**, **Prof^{ra}. Dra Maria Inês Beltrame**, e **Prof. Dr. Professor Filipe Modolo**, pelas oportunidades, apoios e incentivos para realização de trabalhos científicos. Pela confiança neste tempo em que trabalhamos juntos e pelos ensinamentos. Admiro muito a seriedade depositada em seus trabalhos. Certamente nunca os esquecerei.

Aos doutorandos **Artur Breno Wanderley Alécio** e **Isis Encarnação**. Conviver com vocês durante este período, certamente foi uma troca de experiência muito rica. Admiro muito a persistência e

dedicação de cada um de vocês. Sem vocês não seria possível à realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Mário Vinícius Zendron**, pelo incentivo diário na clínica e nos corredores, por acreditar em nossos potenciais. Sua experiência e paciência são fundamentais para o nosso aprendizado. Admiro muito toda sua experiência e talento.

À **Profª. Dr Mabel Cordeiro** por esclarecer minhas dúvidas no seu precioso tempo, e se mostrar sempre disposta a contribuir em qualquer momento.

À minha querida dupla de clínica, **Janayne Nandi**, amiga eterna que nestes últimos anos me proporcionou muitos aprendizados, enfrentando os desafios diários na clínica, em busca de uma Odontologia digna e ética. Certamente foi cúmplice dos meus acertos e erros. Admiro-te muito, não tenho dúvida do teu sucesso profissional. Obrigada pela paciência.

Aos meus colegas de laboratório **Fábio Cardoso, Bianca Bianco, Cléssius Xavier, Caroline Zimmermann, Karin Tomazelli, Elisângela Batistela**, a convivência ao lado de vocês durante esse tempo me fez uma pessoa mais feliz. Obrigada pelos ensinamentos.

A esta **Universidade** que me proporcionou subsídios para construir e lapidar meus conhecimentos, sou grata a todo apoio e incentivo.

EPÍGRAFE

*“Determinação, coragem e autoconfiança
são fatores decisivos para o sucesso.*

*Se estamos possuídos por uma inabalável
determinação conseguiremos superá-los.*

*Independentemente das circunstâncias,
devemos ser sempre humildes, despidos de
orgulho”.*

Dalai Lama

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* o reparo ósseo usando membranas de poliácido láctico-co-glicólico (PLGA), associado ou não a hidroxiapatita (HA). Foram utilizados 9 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultos machos (20-24 semanas) pesando aproximadamente 180g. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: Controle negativo, no qual foram realizados os defeitos ósseos sem recobrimento com membrana; grupos PLGA e PLGA+HA, nos quais os defeitos ósseos foram recobertos com membrana de PLGA e PLGA+HA, respectivamente. Em cada animal foi realizado um defeito circular de 5mm de diâmetro em cada osso parietal. Os defeitos foram tratados aleatoriamente de acordo com os grupos propostos, totalizando 18 defeitos. As amostras foram coletadas após um período experimental de 60 dias, foram descalcificadas e, em seguida, processadas histologicamente. Sequencialmente foi realizada a análise morfométrica para avaliação do reparo ósseo. Após 60 dias observou-se formação óssea em todos os grupos do estudo. O controle negativo apresentou uma média de $4472823,33 \pm$ com um desvio padrão de 2981606,58, o grupo PLGA+HA apresentou uma média de área de $5936871,00 \pm$ e um desvio padrão de 3147235,01, enquanto que o grupo PLGA apresentou uma média de $3658131,60 \pm$ com um desvio padrão de 3484787,33. Não foi possível estabelecer significância no processo de neoformação óssea entre os grupos da pesquisa ($p=0,541$). Uma amostra mais representativa poderá revelar ou não o efeito osseoindutor associado a HA, assim como a associação com uma análise imunohistoquímica de marcadores da formação óssea.

Palavras-chave: Regeneração óssea; Membranas; Hidroxiapatita; Polímeros.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vivo* bone repair using a polylactic acid membrane-co-glycolic acid (PLGA), associated with hydroxyapatite (HA). Nine (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adult males (20-24 weeks) rats weighing approximately 180g were used. The animals were divided into 3 groups: Control group in which the bone defects were realized without covering membrane; PLGA and PLGA + HA groups in which the bone defects were covered with a membrane of PLGA and PLGA + HA, respectively. In each animal a circular diameter 5mm in each parietal bone defect was made. The defects were randomly treated according to the proposed groups, totaling 18 defects. The samples were collected after a trial period of 60 days, decalcified and were followed for histological processing. Sequentially morphometric analysis was performed for evaluation of bone repair. After a period of 60 days bone formation in all study groups was observed. The negative control showed an average of $4,472,823.33 \pm$ with a standard deviation of 2,981,606.58, the PLGA + HA group had a mean area of $5,936,871.00 \pm$ and a standard deviation of 3,147,235.01, while the PLGA group presented 3658131.60 an average \pm standard deviation with a 3484787.33. Unable to establish the significance of bone formation process among groups in this research ($p=0,541$). A representative sample can reveal whether or not the bone inductor effect is associated with HA, well as the association with an immunohistochemical analysis of markers of bone formation.

Keywords: Bone repair; Membranes; Hydroxyapatite. Polymers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hidrólise da PLGA.....	44
Figura 2 - Intervenção cirúrgica, experimental e coleta das amostras..	49
Figura 3 – Programa de processamento de imagem.....	54
Figura 4 - Cortes histológicos em maiores e menores aumentos.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Porcetagem da área de tecido ósseo neoformado correspondente a cada grupo da amostra.....	59
Gráfico 2 – Comparação da área em <i>pixels</i> entre os grupos PLGA+HA, PLGA e controle negativo após o período de 60 dias. Não houve diferença estatística significante entre os três grupos.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PTFE - Politetrafluoretileno

ROG - Regeneração óssea guiada

HA - Hidroxiapatita

PGA - Poliglicólico

PLA - Polilático

PLGA - Ácido poli lático-co-glicólico

PLGA+HA - Ácido poli lático-co-glicólico associada à hidroxiapatita

TGF- β - Fator de crescimento transformante β

RANKL - Receptor de ativação do fator nuclear kappa B

M - CCF - Fator estimulante de colônia de macrófagos

FAD - Food and Drug Administration

EMA - Agência Européia de Medicamentos

H&E - Hematoxilina & Eosina

e-PTFE - Politetrafluoretileno expandido

d-PTFE - Politetrafluoretileno de elevada densidade

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

GL - °Gay Lusac

USA - United States of America

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

CEPA - Comitê de ética em pesquisa animal

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

H⁺ - Cátion

g - Gramas

°C - Graus Celcius

+ - Mais

- - Menos

h - Hora

mm - Milímetro

ChCl₃ - Clorofórmio

m / v - Massa dividida pelo volume

µm - Micrômetro

α - Alfa

γ - Gama

mg - Miligrama

Kg - Quilograma

rpm - Rotações por minuto

ph - Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	27
2.	REVISÃO DA LITERATURA	33
	2.1 Tecido Ósseo	33
	2.2 Regeneração Óssea Guiada (ROG)	37
	2.3 Membranas	40
	2.4 Membranas não Reabsorvíveis	41
	2.5 Membranas Absorvíveis	42
3.	OBJETIVOS	45
	3.1 Objetivo Geral	45
	3.1 Objetivos Específicos	45
4.	METODOLOGIA	46
	4.1 Delineamento do Estudo.....	46
	4.2 Aspectos Ético e Legais.....	46
	4.3 Seleção da Amostra	46
	4.4 Obtenção e Preparo das Membranas de PLGA+HA.....	47
	4.5 Intervenção Cirúrgica	47
	4.6 Coleta da Amostra	51
	4.7 Processamento Histotécnico das Amostras	52
	4.8 Análise Morfométrica	53
	4.9 Análise Estatística	54
5.	RESULTADOS.....	54
	5.1 Análise Histológica Descritiva	55
	5.2 Quantificação da Área de Neoformação Óssea	58
6.	DISCUSSÃO.....	61
7.	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais.....	70

1 INTRODUÇÃO

A partir dos estudos experimentais sobre osteointegração realizados no início da década de 70 por Brånemark, tornou-se viável realizar a reabilitação de pacientes com perdas dentárias através de implantes osseointegrados, tendo em vista os bons resultados dos estudos longitudinais relatados até então (BRÅNEMARK *et al.*, 1969; ADELL *et al.*, 1990; LAMBRECHT *et al.*, 2003).

Adell *et al.* (1990) realizaram um acompanhamento em longo prazo da estabilidade de próteses implantossuportadas instaladas em maxilas e mandíbulas edêntulas em um total de 700 pacientes. Após a instalação dos 4.636 implantes, exames clínicos e radiográficos foram realizados anualmente e a taxa de sucesso observada em maxila e mandíbula foi de 92% e 99%, respectivamente, após um período de 15 anos.

Em outro estudo, onde foram avaliadas as taxas de sobrevivência e sucesso cumulativas, considerando a perda óssea progressiva e a osseointegração dos implantes, Lambrecht *et al.* (2003) obtiveram, respectivamente, taxas de 99,2% e 96,4 em um período de 10 anos. Devido às altas taxas de sucesso em longo prazo, os implantes passaram a ser uma opção para reabilitar as perdas dentárias, decorrentes de processos infecciosos, traumas ou defeitos congênitos.

Alicerçada nos estudos longitudinais de casos clínicos satisfatórios, a implantoterapia tornou-se uma prática cada vez mais comum para realização de reabilitações orais. No entanto, a perda dos elementos dentais e, conseqüentemente, do processo alveolar devido à reabsorção óssea fisiológica, a qual ocorre após a exodontia, resulta na ausência de uma quantidade adequada de estrutura óssea para instalação do implante em

posição proteticamente favorável. Tal fato compromete o resultado funcional e estético da reabilitação final sobre os implantes dentários (ADELL *et al.*, 1990; LEMBRECHET *et al.*, 2003; ARAUJO & LINDHE, 2005).

Nesse contexto, práticas regenerativas na área da odontologia, inicialmente utilizadas com o objetivo de regenerar os tecidos periodontais perdidos como consequência da doença periodontal, começaram a ganhar força no cenário científico do final do século XX (NYMAN *et al.*, 1982a; NYMAN *et al.*, 1982b).

Em um estudo realizado em macacos com o objetivo de regenerar os tecidos de sustentação do elemento dental, Nyman *et al.* (1982a) utilizaram uma membrana de *millipore* sobre raízes dentais onde previamente foram removidos cimento e ligamento periodontal. Os resultados mostraram formação de novo cimento e novas fibras colágenas do ligamento periodontal, corroborando a comprovação do potencial regenerativo das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal, proposta previamente por alguns autores (MELCHER, 1976; KARRING *et al.*, 1980; NYMAN *et al.*, 1982a).

No mesmo ano, um estudo clínico realizado pelo mesmo autor, utilizando uma membrana de celulose na superfície da raiz após preparo mecânico, também obteve sucesso, evidenciando a presença de novo cimento e inserção de fibras colágenas. A utilização de uma membrana para a realização da regeneração dos tecidos periodontais perdidos ficou conhecida em periodontia como o princípio da Regeneração Tecidual Guiada (NYMAN *et al.*, 1982b).

Um dos primeiros estudos a investigar a técnica regenerativa para formação de tecido ósseo em odontologia foi proposto por Dahlin *et al*

(1988), onde foi avaliada a quantidade de tecido ósseo formado em torno de defeitos ósseos criados na região do ângulo da mandíbula de ratos. No lado teste, estes defeitos foram cobertos com membrana semipermeável de teflon, enquanto no lado controle nenhuma membrana foi colocada sobre os defeitos. A partir dos cortes histológicos, pôde-se observar uma ossificação após 3 semanas no lado teste, enquanto no lado controle após 22 semanas pouco ou nenhum sinal de formação óssea ficou evidente. (DAHLIN *et al.*, 1988).

Duas situações clínicas, utilizando o mesmo princípio, foram relatadas por Nyman *et al.* (1990). Em um dos casos, foram utilizadas membranas de Politetrafluoretileno (PTFE) para corrigir um defeito ao redor do implante imediato. No segundo caso, o objetivo foi realizar aumento do volume ósseo no sentido vestibulo-língual em uma área desdentada para posterior reabilitação através de implante. Ambos os casos obtiveram sucesso, tanto na formação óssea ao redor do implante, quanto no ganho de volume horizontal.

Evidências também se fizeram presentes em situações clínicas apresentadas por Dahlin *et al.* (1991). Na tentativa de neoformar osso ao redor de implantes utilizando membranas de PTFE, os autores obtiveram um aumento ósseo variando entre 0,5 e 3mm que mostrou uma completa cobertura óssea. Demonstrando o potencial deste princípio biológico para regeneração óssea em seres humanos. Dessa maneira, a Regeneração Óssea Guiada (ROG) foi introduzida em odontologia como uma modalidade terapêutica previsível.

Esse foi um importante passo para a regeneração óssea em situações clínicas como, por exemplo, em alvéolos após a exodontia, defeitos periimplantares, defeitos ósseos císticos e tumorais dos maxilares. Assim, a

regeneração do tecido ósseo através da utilização de membrana semipermeável ficou conhecida como ROG (BUSER *et al.*, 2010).

As membranas passaram a ser fundamentais na ROG, impedindo que células epiteliais e do tecido conjuntivo mole adjacente à ferida cirúrgica pudessem alcançar o defeito ósseo de maneira precoce, dando assim, prioridade às células específicas, presumivelmente com um maior potencial osteogênico para promover a regeneração do tecido ósseo (MELCHER, 1976).

Atualmente, várias membranas têm sido desenvolvidas para serem empregadas nessa técnica, na premissa de exclusão celular e manutenção do espaço, contribuindo com esse procedimento regenerativo, a fim de obter um resultado previsível. Encontram-se disponíveis no mercado as membranas absorvíveis e não absorvíveis. As propriedades ideais de uma membrana incluem: biocompatibilidade, oclusão celular, formação e manutenção de um espaço para a formação do coágulo, integração tecidual, fácil manuseio e suscetibilidade limitada às complicações (BUSER *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, o aprimoramento das pesquisas experimentais, os resultados de ensaios clínicos bem sucedidos e os estudos prospectivos têm demonstrado à eficácia da técnica da ROG com a associação do uso de membranas, sejam elas absorvíveis ou não. Estas práticas possibilitaram um subsídio científico para a realização das práticas regenerativas do tecido ósseo de maneira previsível, sendo possível a colocação das próteses implantossuportadas em áreas edêntulas onde se necessita uma estrutura óssea adequada (JUNG *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2013; SCHNEIDER *et al.*, 2014).

Com o objetivo de aperfeiçoar as propriedades biológicas das membranas, atualmente tem-se associado moléculas sinalizadoras. Essas moléculas são representadas por nanopartículas bioativas que estão envolvidas no controle do crescimento e diferenciação celular, como estrôncio, β -trifosfato de cálcio e hidroxiapatita (HA), razão pela qual têm sido atualmente objeto de estudos com o intuito de favorecerem o processo de reparo ósseo. Concomitante a isso, tem-se associado às membranas, medicamentos como antibióticos ou anti-inflamatórios, a fim de reduzir a infecção no local a ser regenerado (LEE *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012; HAO *et al.*, 2013; SCHNEIDER *et al.*, 2014).

A HA é um mineral natural constituinte dos ossos e dentes humanos e, tendo em vista a similaridade com o osso humano, é considerado um dos materiais mais biocompatíveis. A HA é caracterizada por suas propriedades de osseoindução, além de favorecer a proliferação dos fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas. Somadas a essas propriedades possui ainda a capacidade de adsorver e/ou absorver substâncias ou fármacos, podendo ser utilizada como carreadora de medicamentos, bem como na remoção de resíduos em casos de descontaminação da água e do solo poluídos (NAGEM & FILHO, 2006; COSTA *et al.*, 2009).

No contexto atual, a ROG está associada ou não a substitutos ósseos, que podem ser autógenos, alógenos, xenógenos ou aloplásticos, e consiste na utilização de membranas, absorvíveis ou não, para o tratamento de defeitos ósseos localizados em rebordos alveolares ou ao redor de defeitos periimplantares. Desta forma, esta técnica tornou-se uma opção de tratamento viável e previsível (BUSER *et al.*, 2010).

As membranas utilizadas em ROG e podem ser de dois tipos: 1) Absorvíveis – de origem animal representada pelas membranas de colágeno

de diversas fontes animais; ou sintéticas – que são membranas derivadas de poliésteres sintéticos alifáticos como o poliglicólico (PGA), polilático (PLA) e seus copolímeros como, por exemplo, as membranas de ácido polilático-co-glicólico (PLGA). 2) Não absorvíveis - grupo das membranas de politetrafluoretileno (PTFE) expandido ou não. Apesar de serem classificadas em dois grupos, cada membrana possui sua característica intrínseca (HAMMERLE & JUNG, 2003; BUSER, 2010).

As membranas poliméricas de PLGA têm sido utilizadas com sucesso em ROG, tendo em vista sua susceptibilidade de degradação por hidrólise dando origem aos monômeros ácido lático e ácido glicólico que são facilmente degradados, apresentando baixa toxicidade (DANHIER *et al.*, 2012).

Com base nesses conhecimentos, objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de análise morfométrica, a quantidade de tecido ósseo neoformado através da utilização de membranas absorvíveis de (PLGA) associadas ou não a hidroxiapatita (PLGA+HA) em defeitos ósseos na calota craniana de ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo

O osso representa o arcabouço estrutural do corpo humano e, assim como outros órgãos, é constituído por vários tecidos, tais qual o ósseo e o conjuntivo (hematopoiético, adiposo), vasos sanguíneos e nervos. Dentre suas principais funções, podemos citar sustentação, proporcionada pela rigidez que lhe é característica, e proteção de nobres estruturas do corpo humano como cérebro, caixa torácica, medula espinhal e abdômen. O osso está envolvido também nos processos de movimento e locomoção, suporte dentário para trituração dos alimentos e alojamento da medula óssea, que é um órgão hematopoiético. Serve ainda de alavanca para os músculos esqueléticos fixados a ele, multiplicando a força muscular para realização do movimento, bem como está ligado a hemostasia do cálcio, posto que é onde se encontra o maior reservatório desse mineral no organismo, representando cerca de 99% em condições de normalidade (FINN, 2003; GARTNER & HIATT, 2007; BUSER, 2010).

O osso é uma forma especializada de tecido conjuntivo e assim é constituído por células e matriz extracelular, distinguindo-se dos outros tecidos conjuntivos pela mineralização da sua matriz. A matriz óssea inorgânica representa 50% do peso de sua estrutura e sua mineralização é dada por íons de cálcio e fósforo na forma de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Sua parte orgânica é constituída por 95% de colágeno tipo I, e 5% de proteínas não colágenas. A associação dada pela hidroxiapatita com as fibras colágenas caracteriza a resistência inerente do tecido ósseo (ROSS, REITH & ROMRELL, 1993; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2003).

Do ponto de vista macroscópico, podemos encontrar duas diferentes organizações do tecido ósseo. Uma é representada pela substância esponjosa ou osso trabecular, que é caracterizado por finas folhas formando o retículo esponjoso, cujos espaços são intercomunicantes e ocupados pela medula óssea. Essa porção é revestida por um tecido conjuntivo especializado, delgado, composto por uma monocamada de células osteoprogenitoras e osteoblastos, o qual recebe o nome de endóstio. A outra organização é representada pelo osso compacto, também chamado de substância compacta ou osso cortical, caracterizado por uma massa compacta e densa do tecido ósseo. Externamente, podemos encontrar revestindo essa organização o perióstio, cuja camada externa é composta por um tecido conjuntivo fibroso denso não modelado, rico em fibras colágenas e não mineralizado, que auxilia na distribuição do suprimento sanguíneo vascular e nervoso para o osso, e uma camada celular interna contendo células osteoprogenitoras e osteoblastos, que se insere no osso por meio das fibras de Sharpey (GARTNER & HIATT, 2007; BUSER, 2010).

Existem quatro tipos de células que caracterizam o tecido ósseo, as células osteoprogenitoras ou de revestimento ósseo, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (GARTNER & HIATT, 2007).

As células osteoprogenitoras são consideradas células de repouso, de reserva ou quiescentes, essas células são derivadas do mesênquima embrionário, possuem potencial de passar por mitoses e podem se diferenciar em osteoblastos. São mais ativas durante o período de crescimento ósseo intenso e podem ser encontradas na superfície dos ossos durante o crescimento e durante o remodelamento, podendo ser observadas também na camada mais interna periosteal e endosteal e revestindo os canais de Havers e de Volkmann (GARTNER & HIATT, 2007).

Os osteoblastos são derivados das células osteoprogenitoras, são formados através de estímulos do fator de crescimento transformante β (TGF- β). Os osteoblastos são células responsáveis pela histogênese do tecido ósseo, a partir da secreção de matriz óssea, através da produção dos componentes orgânicos que a compõe, como glicídicos, colágeno tipo I, proteoglicanos, glicoproteínas e componentes proteicos como:

- **RANKL** – Receptor de ativação do fator nuclear kappa B.
- **Osteocalcina** – Possuem papel na mineralização óssea. É produzida pelos osteoblastos durante o processo de síntese da matriz óssea.
- **Osteopontina** – Proteína produzida por osteoblastos e é um componente da mineralização da matriz extracelular durante a formação óssea, sendo muito importante na osteogênese, pois facilita a adesão dos osteoblastos a matriz óssea.
- **Osteonectina** – Relacionada à mineralização óssea.
- **Sialoproteína óssea** – Promove a ligação de osteoblastos a matriz extracelular.
- **M - CCF** – Fator estimulante de colônia de macrófagos.

Posteriormente, a matriz óssea formada por essas células sofrerá mineralização. Os osteoblastos podem ser encontrados na superfície no tecido ósseo. Quando estão secretando matriz, pode ser observado histologicamente um citoplasma basofílico e microscopicamente apresentam-se de forma cúbica ou poligonal. A partir da exocitose dos seus produtos ocorre o aprisionamento destas células, que passam à denominação de osteócitos, se alojando em um espaço lacunar e se

separando dos demais osteoblastos por uma delgada matriz óssea recém-formada, ainda imatura, o osteóide (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2003; GARTNER & HIATT, 2007).

Estas células possuem prolongamentos citoplasmáticos, que se abrigam nos canalículos, interligam as lacunas celulares vizinhas e contêm o fluido extracelular. Elas facilitam o fluxo de nutrientes, metabólitos celulares e hormônios. Esses prolongamentos entram em contato com os prolongamentos das células vizinhas e estabelecem as junções comunicantes, que permitem a movimentação de íons e pequenas moléculas (GARTNER & HIATT, 2007). Os osteócitos são vistos na microscopia achatados com formato de amêndoa. Sua morte é seguida pela reabsorção da matriz (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2003).

Já as células denominadas osteoclastos são células multinucleadas, encontradas na superfície da matriz óssea. Responsáveis pela reabsorção óssea, eles liberam ácido (H^+), hidrolases e collagenases, que digerem a matriz orgânica e dissolvem os cristais de hidroxiapatita, formando na superfície da matriz óssea depressões conhecidas como lacunas de Howship. Estas células são originadas de precursores mononucleados provenientes da medula óssea. Sua atividade é controlada por citocinas e hormônios como a calcitonina e paratormônio (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2003).

Microscopicamente, podemos classificar o osso em primário, também chamado osteóide (imaturo), ou secundário conhecido também como lamelar (maduro). Ambos são constituídos de maneira semelhante, tanto no que se refere aos componentes celulares quanto na constituição da matriz óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2003).

O osso primário é imaturo, podendo ser encontrado nos estágios iniciais do desenvolvimento fetal e durante reparos ósseos. Possui como características a abundância de osteócitos e a presença de feixes de fibras colágenas não modeladas dispostas irregularmente, com menor mineralização que o osso lamelar. Mais tarde, será substituído por osso secundário. O osso secundário (ou osso lamelar), por sua vez, apresenta uma disposição de fibras colágenas organizadas em lamelas de três a sete micrômetros de espessura, paralelas umas às outras, ou se dispõe em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando o sistema Havers ou osteon. Cada ósteon é um cilindro, às vezes bifurcado, formado por quatro a 20 lamelas ósseas concêntricas. Os canais de Havers comunicam entre si com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos, que atravessam as lamelas, os canais de Volkmann (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2003; BUSER, 2010).

2.2 Regeneração Óssea Guiada (ROG)

A regeneração é caracterizada por apresentar uma organização em que se estabelece a substituição das células mortas ou lesadas, por células idênticas as originais, promovendo uma restituição da integridade das estruturas anatomofuncionais (RUBIN, 2006).

O princípio da exclusão celular com a utilização de membranas para a regeneração dos tecidos tem sido aplicado na medicina desde meados dos anos 50 para regeneração neural da medula espinhal, pois permite que o tecido mole permaneça fora da área onde se deseja exclusividade de um preenchimento ósseo (MURRAY, 1957).

Nas cirurgias de enxertos ósseos, em que se objetiva uma regeneração desse tecido, uma membrana geralmente é utilizada como recobrimento para impedir que células epiteliais e do tecido conjuntivo mole povoem os defeitos ósseos enxertados, dessa forma, torna-se imprescindível à utilização de uma membrana para que haja a exclusão celular seletiva. A membrana deve ser colocada sobre o enxerto, e o perióstio deve ser mantido na superfície externa da membrana. Posteriormente, a sutura mucoperiosteal é realizada, de forma a criar-se uma barreira para que apenas células osteogênicas adjacentes possam migrar e restabelecer a estrutura óssea perdida (BUSER, 2010).

BUSER *et al.* (1999) propuseram indicações da técnica da regeneração óssea guiada: 1) Defeitos provocados por extração imediata ou tardia. 2) Defeitos em forma de deiscência na região da crista óssea ao redor de implantes. 3) Defeitos em forma de fenestração na área mais apical de implantes. 4) Aumento lateral do rebordo. 5) Aumento vertical do rebordo. 6) Elevação do seio maxilar combinado ou não com aumento do rebordo.

Herman & Büser (1996) abordaram cinco fatores cirúrgicos necessários para obtenção de resultados previsíveis em ROG: 1) Uso de uma membrana apropriada. 2) Obtenção de uma cicatrização primária dos tecidos. 3) Criação e manutenção de um espaço protegido pela membrana. 4) Adaptação e estabilização da membrana ao redor do defeito. 5) Período de cicatrização suficientemente longo.

Segundo Schroeder *et al.* (1986), o processo alveolar é formado durante a erupção dental, por isso é considerado dente dependente. Após a exodontia, seja ela simples ou múltipla, a reabsorção do processo alveolar é instalada rapidamente.

Araújo & Lindhe (2005), estudando as alterações do osso alveolar após exodontia em cães, observaram que alterações dimensionais ocorrem de maneira significativa após oito semanas. Esse processo resulta em diminuição horizontal das paredes ósseas alveolares, tanto vestibular quanto lingual, se mostrando mais acentuada na parede vestibular, ocorrendo à custa de atividade clástica.

Alguns autores apontam outros fatores, além da reabsorção fisiológica, que podem ser responsáveis pela ausência de estrutura óssea suficiente para reabilitação com implantes osseointegráveis, necessitando prévia regeneração óssea da área a ser reabilitada. Entre eles estão periodontites, uso prolongado de próteses removíveis, más formações congênitas (como fissuras palatinas) e traumas (CHIAPASCO *et al.*, 2009).

Um estudo multicêntrico realizado em 2001 avaliou retrospectivamente, em um período compreendido em 5 anos, a sobrevivência e a saúde dos tecido periimplantares de 123 implantes inseridos em rebordos no momento ou após o aumento ósseo vertical pela técnica da ROG associado ao uso de membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) reforçada por titânio para proteção do enxerto ósseo. Parâmetros radiográficos e clínicos como presença de placa, supuração, profundidade de sondagem e presença de bolsa foram avaliados para cada implante. Durante o acompanhamento clínico longitudinal, apenas oito implantes foram perdidos, o que representou uma taxa de sucesso de 97,5% de sobrevivência dos implantes. Os autores concluíram que o osso regenerado pela técnica da ROG reage clinicamente de maneira semelhante ao osso nativo (SIMION *et al.*, 2001).

BLANCO e colaboradores (2004) avaliaram, em um estudo prospectivo multicêntrico, a eficácia e a previsibilidade da técnica da ROG após cinco

anos de acompanhamento, realizando uma abordagem simultânea em pacientes com defeitos ósseos periimplantes (deiscências e fenestrações). Foram avaliados 19 pacientes totalizando 20 deiscências e seis fenestrações associadas a enxerto ósseo liofilizado ou autógeno recoberto por membranas absorvíveis. Após cinco anos, a taxa de sobrevivência dos implantes foi de 96,4 % enquanto o nível ósseo marginal apresentou uma média de 2,03 mm, não havendo diferenças estatísticas na comparação entre cristas ósseas marginais mesiais e distais.

Sendo assim, a técnica da ROG simultânea ou não à instalação de implantes pode ser considerada uma terapia segura, previsível, desde que associada o alto rigor técnico exigido em sua execução, e com uma alta taxa de sobrevivência dos implantes, tendo em vista que um dos fatores chave para se alcançar a osseointegração é a presença de volume ósseo adequado.

2.3 Membranas

O uso de membranas tornou-se fundamental nos procedimentos de ROG, tendo em vista que o padrão de crescimento ósseo exige um maior tempo para sua formação quando comparado aos tecidos conjuntivos não mineralizados, visto que os fibroblastos proliferam e produzem matriz de colágeno mais rapidamente que os osteoblastos para secretar a matriz óssea e mineralizá-la. Logo, as membranas proporcionam uma seleção celular impedindo que células de tecido mole indesejáveis ocupem o sítio ósseo em cicatrização, favorecendo um íntegro crescimento ósseo no sítio desejado (MELCHER, 1976; DAHLIN *et al.*, 1990; NYMAN *et al.*, 1991).

Os requisitos básicos de uma membrana utilizadas na ROG incluem: 1) Biocompatibilidade - caracterizada por inúmeros critérios como

citotoxicidade, histocompatibilidade, genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos microbianos, define a capacidade de um material desempenhar uma função específica sem causar reações locais e sistêmicas exacerbadas no hospedeiro. 2) Oclusão celular - que permite a exclusão de células do tecido conjuntivo da região a ser regenerada. 3) Integração tecidual - relacionada à topografia, porosidade e química de superfície. Quanto melhor a integração tecidual, mais favorável será a estabilidade mecânica da área a ser regenerada. 4) Formação e manutenção de espaço – evitando colapso do material que proporcionará as células do tecido conjuntivo organizarem o coágulo e produzirem a matriz óssea. Trata-se da rigidez apresentada pela membrana. 5) Permitir fácil manuseio durante a cirurgia (BUSER, 2010).

2.4 Membranas Não Reabsorvíveis

A utilização das membranas de PTFE foi considerada inicialmente em Odontologia como padrão na ROG. Sendo este polímero caracterizado como de elevada estabilidade, estudos demonstraram uma favorável regeneração óssea (DAHLIN *et al.*, 1990; NYMAN *et al.*, 1991).

As membranas de PTFE são sintetizadas a partir do fluoropolímero que apresenta uma forte ligação entre carbono e flúor. A inexistência de uma enzima capaz de clivar as ligações entre carbono e hidrogênio torna essas membranas não absorvíveis (BUSER, 2010).

Podemos encontrar três membranas obtidas a partir do PTFE: 1) Membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE). 2) Membranas de

politetrafluoretileno de elevada densidade (d-PTFE). 3) Membranas de e-PTFE reforçadas por titânio. Estudos clínicos e experimentais mostram resultados satisfatórios quando essas membranas são associadas à ROG. As mesmas possuem ótima biocompatibilidade, são consideradas inertes por não provocar reações imunológicas e propiciam manutenção de um espaço adequado para acomodação do coágulo e estabilidade (BUSER, 2010).

No entanto, existem algumas desvantagens associadas ao seu uso, como o risco de exposição precoce ou infecção pós-cirúrgica, podendo comprometer a regeneração ou a osseointegração. Outra desvantagem associada é a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, o que acarreta desconforto, estresse psicológico ao paciente, morbidade aumentada, risco de danos aos tecidos e elevado custo. Atualmente, as membranas não absorvíveis estão perdendo importância na prática clínica, tendo em vista a eficácia das membranas absorvíveis.

2.5 Membranas Absorvíveis

Atualmente, as membranas absorvíveis utilizadas em ROG são as membranas de colágeno e de poliésteres alifáticos (ácido polilático, poliglicólico e seus copolímeros). As membranas colágenas foram criadas especialmente na tentativa de superar uma das principais desvantagens associadas às membranas de PTFE como a exposição de infecção do sítio ósseo. Atualmente pode ser encontrado no mercado membranas de colágeno tipo I, ou membranas de colágeno combinadas tipo I e tipo III (BUNYARATAVEJ & WANG, 2001).

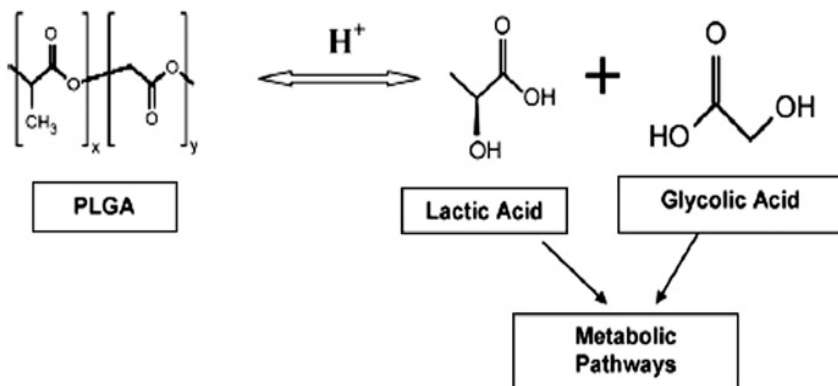
As membranas colágenas podem ser derivadas de diversas origens animais como, por exemplo, derme e tendão bovino, pela de ovinos e derme

de suínos. Essas membranas apresentam como vantagens baixa imunogenicidade, facilidade de manipulação, desempenha papel ativo na formação do coágulo, é quimiotático para fibroblastos gengivais, além de ser um dos principais componentes do ligamento periodontal. Embora existam propriedades favoráveis observam-se propriedades mecânicas favoráveis, além da rápida biodegradação proporcionada por atividades enzimáticas dos macrófagos e dos leucócitos polimorfonucleares (BUNYARATAVEJ & WANG, 2001; ROTHAMEL *et al.*, 2004).

A fim de proporcionar a longevidade dessa membrana no sítio cirúrgico foram desenvolvidas membranas colágenas com ligações cruzadas, viabilizando assim um maior tempo de permanência dessa membrana no sítio proposto (BUNYARATAVEJ & WANG, 2001).

Atualmente as membranas derivadas dos poliésteres alifáticos têm sido amplamente utilizadas na engenharia de tecidos, por exemplo, as membranas de PLGA, fabricadas através da copolimerização do ácido glicólico e láctico. A utilização das membranas a base desse polímero tem se demonstrado bastante promissor devido a sua biocompatibilidade (OWEN *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2013).

O PLGA é um dos biopolímeros que apresenta o melhor sucesso em termos de biodegradação, pois os monômeros resultantes de sua degradação (ácido láctico e o ácido glicólico) (Figura 2) são monômeros endógenos que são facilmente degradados pelo ciclo de Krebs. O uso do PLGA foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e Agência Européia de Medicamentos (EMA) em vários sistemas de distribuição, e estão disponíveis no mercado com pesos moleculares diferentes. A sua degradação pode variar de vários meses ou anos dependendo do seu peso molecular (BUSER, 2010; DANHIER *et al.*, 2012)

Figura 1 – Processo de hidrólise do PLGA

Fonte: Extraído de Danhier, 2012.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vivo* o potencial osteopromotor das membranas de PLGA associadas ou não à hidroxiapatita em defeitos ósseos na calota craniana de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar uma análise descritiva dos achados histológicos associados aos grupos do presente estudo.
2. Mensurar a área do tecido ósseo neoformado, através dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) referentes a cada grupo.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento do Estudo

O Estudo proposto é do tipo experimental em laboratório.

4.2 Aspectos Éticos e Legais

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da referida Universidade, sob o protocolo PP00831 (Anexo 1).

4.3 Seleção da Amostra

Foram utilizados 9 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultos machos (20 – 24 semanas) pesando aproximadamente 180g. Os animais foram mantidos em condições similares, em sala com 22°C +/- 2°C, 60% +/- 5% de umidade e em ciclo claro/escuro de 12/12h. Os ratos foram alimentados com dieta sólida padrão e água. Os experimentos foram iniciados após um período de 3 dias de aclimação. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: *Sham*, grupo no qual foram realizados os defeitos ósseos sem recobrimento com membrana; PLGA e PLGA+HA, grupos nos quais os defeitos ósseos foram recobertos com membrana de PLGA e PLGA+HA respectivamente. Em cada animal foi realizado um defeito circular de 5mm de diâmetro em cada osso parietal. O defeito foi tratado aleatoriamente de acordo com os grupos propostos, totalizando 18 defeitos e as amostras foram coletadas após um período de 60 dias.

4.4 Obtenção e Preparo das Membranas de PLGA+HA

As membranas foram produzidas com copolímero de poli ácido láctico-co-glicólico associado à hidroxiapatita (PLGA+HA), obtidos pela técnica de evaporação de solvente. O copolímero de poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA) (Resomer, Evonik Ind., Essen - Alemanha), na proporção 82:18 (m:m), foi dissolvido em clorofórmio PA (ChCl₃ – Synth – LabSynth, Diadema, Brasil) (10% m/v) em temperatura ambiente. Após a dissolução completa do polímero, foram adicionadas partículas de 50 µm de hidroxiapatita (30% m/v) (Genphos Genius, Baumer, Mogi Mirim, Brasil). Essa solução foi vertida em moldes e, após a evaporação do solvente em temperatura ambiente, as peças foram recortadas com uma tesoura para obtenção das amostras com dimensões de 15 x 20 x 0,5mm para recobrimento do defeito ósseo criado na calvária dos ratos. Depois de prontas, as amostras foram embaladas e submetidas à esterilização com radiação γ.

4.5 Intervenção Cirúrgica

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de 90mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec, Cotia – São Paulo) e 10mg/kg cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec, Cotia – São Paulo). A parte dorsal do crânio foi tricotomizada (Figura 2-A) e foi realizada a antisepsia com algodão embebido em solução de iodopovidine (Povidine, Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo) (Figura 2-B), com o animal posicionado sobre a mesa cirúrgica em decúbito ventral e com a cabeça imobilizada em três pontos fixos com o auxílio de uma mesa para estereotaxia (Figura 2-C).

Uma incisão cutânea e muscular de 15 a 20mm de comprimento foi realizada na porção posterior da calvária ao longo da sutura sagital, com auxílio de bisturi e lâmina nº 15 (Swann-Morton® SurgicalBlades, Inglaterra) (Figura 2-D). A pele e o tecido subcutâneo foram refletidos e, em seguida, os tecidos subjacentes divulsionados com o auxílio de uma tesoura pequena com extremidade romba e pinça de dissecação até a exposição do periósteo (Figura 2-E), que foi incisado permitindo a exposição do osso parietal (Figura 2-F).

Dois defeitos ósseos foram realizados, um em cada osso parietal, laterais à sutura sagital (lado direito e lado esquerdo). Os defeitos foram realizados com o auxílio de uma broca trefina de 5mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba - Paraná) montada em um motor cirúrgico (NSK®, Kanumashi - Japão) com contra-ângulo (NSK®, Kanumashi - Japão) apresentando redução de 20:1 e rotação de 1000rpm, sob irrigação constante com solução salina para prevenir o superaquecimento das paredes ósseas. Esse procedimento foi realizado delicadamente para evitar a exposição da dura-máter (Figuras 2-G, 2-H, 2-I).

Cada animal foi incluído em dois dos três grupos da amostra, ou seja, cada defeito foi regenerado aleatoriamente de acordo com um dos tipos de tratamento proposto (Figuras 2-J).

O periósteo e o tecido subcutâneo foram reposicionados e suturados com fio de sutura Vicril 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson Company, SP, Brasil) e o tecido cutâneo com fio Nylon 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson Company, SP, Brasil) (Figuras 2-K, 2-L). Os animais foram monitorados diariamente.

Figura 2 - Intervenção cirúrgica, experimental e coleta das amostras.

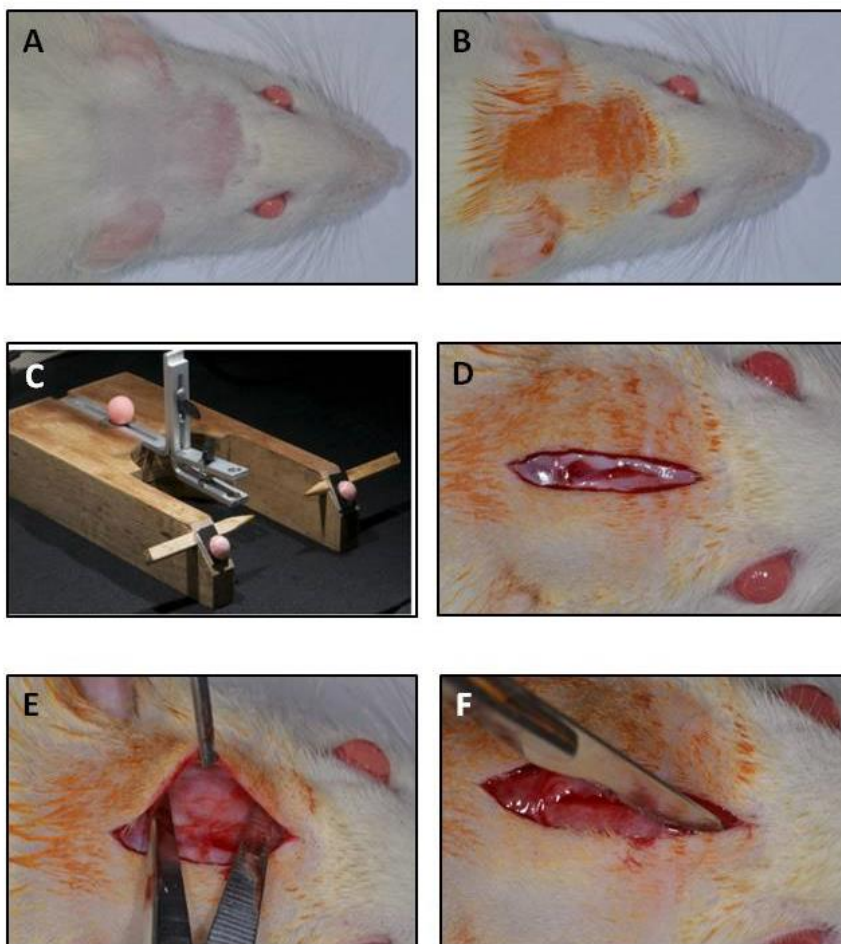




Figura 2-Intervenção cirúrgico, experimental e coleta das amostras;

A – Área tricotomizada; **B** – Preparação asséptica pré-cirúrgica da área com Iodo-Polvinide; **C** – Mesa utilizada para estereotaxia; **D** – Incisão cutânea; **E** – Divulsão dos tecidos; **F** – Incisão periosteal; **G** – Defeitos realizados nos ossos parietais com a broca trefina de 5 mm de diâmetro; **H** – Tecidos ósseos do interior da trefina removidos pode-se observar vasos sanguíneos e exposição da dura-máter pelo defeito ósseo. Esta imagem também ilustra o tratamento realizado pelo controle negativo; **I** – Remoção dos fragmentos ósseos; **J** – Membranas de PLGA (esquerda) e PLGA+HA (direita) posicionadas sobre o defeito; **K** – Sutura do periósteo e estabilização das membranas; **L** – Sutura cutânea; **M** – Calota craniana dissecada após o período de 60 dias.

4.6 Coleta das Amostras

Decorridos 60 dias de pós-operatório, os animais foram anestesiados como detalhado previamente e receberam perfusão de solução salina a 0,9% seguida de solução de paraformaldeído a 4% (pH 7.4) através da aorta ascendente. O crânio foi dissecado e os ossos parietais removidos com o tecidos circundantes intactos (Figura 2-M).

4.7 Processamento Histotécnico das Amostras

As amostras destinadas à processamento histotécnico foram imersas em recipientes de vidro previamente identificados de acordo com seu grupo, contendo solução de formaldeído tamponado a 10% (Sigma-Aldrich), por 24h à temperatura ambiente. Após a conclusão da fixação, as amostras foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). Durante o processo de desmineralização, as amostras foram avaliadas semanalmente por meio de soluções que identificam cálcio disperso na solução. Para isso, foram utilizadas soluções de oxalato de amônia 5% e hidróxido de amônia, bem como igual quantidade da solução que esteve em contato com a amostra. As soluções foram misturadas e avaliadas após 30 minutos, onde foi observado se houve ou não turbidez da solução. O processo de descalcificação seguiu-se até que a solução se mostrou clarificada. Após a descalcificação completa, as amostras foram seccionadas transversalmente a sutura sagital mediana na região mediana do defeito realizado, e seguiram para o seguinte processamento histotécnico no laboratório da Pós - Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina:

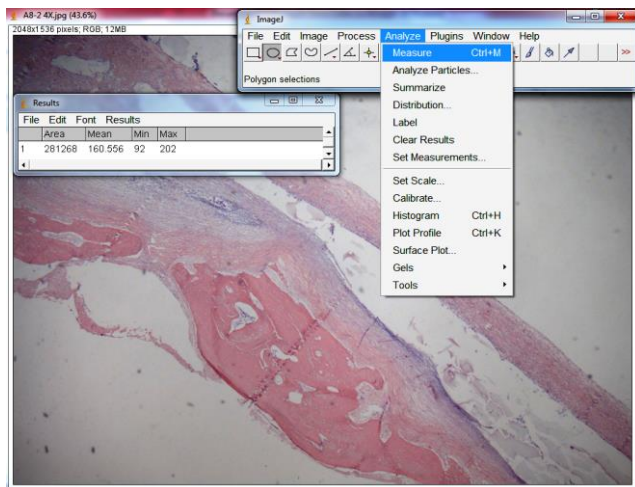
- A. **Desidratação** – As amostras foram submetidas a consecutivas trocas de álcool em crescentes graduações (álcool 70 ° GL, álcool 96° GL, álcool etílico absoluto) objetivando remover a água dos tecidos;
- B. **Diafanização (ou clareamento) em Xilol** – As amostras foram embebidas em uma substância miscível com parafina;

- C. **Impregnação pela Parafina Fundida a 60°C** - Onde vasos e espaços intercelulares e do interior da célula foram impregnados, tornando mais fácil a obtenção dos cortes ao micrótomo;
- D. **Inclusão em Parafina** – Obtenção do bloco para serem realizados os cortes no micrótomo;
- E. **Microtomia** – As seções histológicas foram microtomizadas com 5µm de espessura.
- F. **Coloração em hematoxilina e eosina - H&E** – As lâminas foram em corantes acidofílico e basofílico respectivamente.

4.8 Análise Morfométrica

As lâminas coradas por H&E foram examinadas ao microscópio de luz (Carl Zeiss) com câmera digital (Cannon 7.1 mega pixel) acoplada, com objetiva 4x, percorrendo toda a extensão do corte com a finalidade de localizar o tecido ósseo formado e adjacente às áreas de reparo. Após a localização da região foram realizadas quatro fotografias em aumento de 4x de cada amostra, para que toda a extensão do corte pudesse ser analisada. Posteriormente a área de tecido ósseo neoformado foi mensurada utilizando-se um Software para Processamento e Análise de Imagens (IMAGEJ). Cada fotografia foi mensurada três vezes. Foi realizada uma média das três medidas em cada uma das quatro fotos correspondente a uma amostra. Ao final a média de cada uma das fotos foi somada o que correspondeu a área óssea neoformada em pixels. (Figura 3).

Figura 3 – Programa de processamento de imagem - IMAGEJ.



Fonte: Adaptado de Image Processing and Analysis in Java, 2014.

1 - Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em set. 2014.

4.9 Análise Estatística

Os dados referentes às medidas foram tabulados no Excel® e exportados para o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) versão 20.0 para análise. Para testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk e para verificar a normalidade das variâncias foi aplicado o teste de Levene. Para verificar se existe diferença estatística significativa foi aplicado o ANOVA, o nível de significância adotado foi $\alpha < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise Histológica Descritiva

Nos cortes histológicos transversais dos defeitos cirúrgicos ósseos criados na calota craniana da presente amostra, corados em H&E, pode-se observar após um período de 60 dias da implantação da membrana neoformação do tecido ósseo nos três grupos propostos (Figuras 4-A, 4-B, 4-C). Tanto nos grupos testes como no grupo controle foi possível observar a presença de um tecido ósseo imaturo, caracterizado por abundância de osteócitos.

Nos defeitos de PLGA+HA pode-se observar formação de matriz óssea abaixo da membrana, essa matriz encontra-se bastante celularizada com presença abundante de lacunas osteocíticas preenchidas por osteócitos, deposição de fibras colágenas arrançadas densamente localizavam-se permeando as trabéculas ósseas, essas fibras mostraram-se mais presentes nas amostras deste grupo (Figura 4-D).

Em quatro amostras do grupo PLGA+HA não foi possível observar formação óssea completa na parte central do defeito, sendo preenchida por fibras colágenas. Foi possível observar remanescentes da membrana cobrindo todos os defeitos dos grupos testes (Figura 4-E).

Nas amostras do grupo PLGA foram observadas características semelhantes às encontradas no grupo PLGA+HA, porém com menor deposição de fibras colágenas entre as trabéculas ósseas.

Em algumas amostras de ambos os grupos testes não foi possível observar os remanescentes da membrana. Não foi observado encapsulamento fibroso da membrana em nenhuma amostra dos grupos testes.

Nos grupos controles pode-se observar uma neoformação óssea mais homogênea em espessura e mínima deposição de fibras colágenas

entre as trabéculas ósseas neoformadas, quando comparado com os grupos testes. Observou-se também a presença de inúmeras lacunas osteocíticas com a presença de osteócitos.

Foi observada a presença de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, com a presença de células gigantes multinucleadas em apenas uma amostra do grupo PLGA+HA. Nesta amostra foi encontrada no pós-operatório a presença de edema na região do defeito, como consequência de lesão na dura-máter durante o ato cirúrgico, esta amostra foi excluída da análise, pois a lesão comprometeu a neoformação óssea no local (Figura 4-F).

Em todos os grupos foi possível observar a presença de osteoblasto na periferia da matriz óssea.

Figura 4 – Cortes histológicos em maiores e menores aumentos.

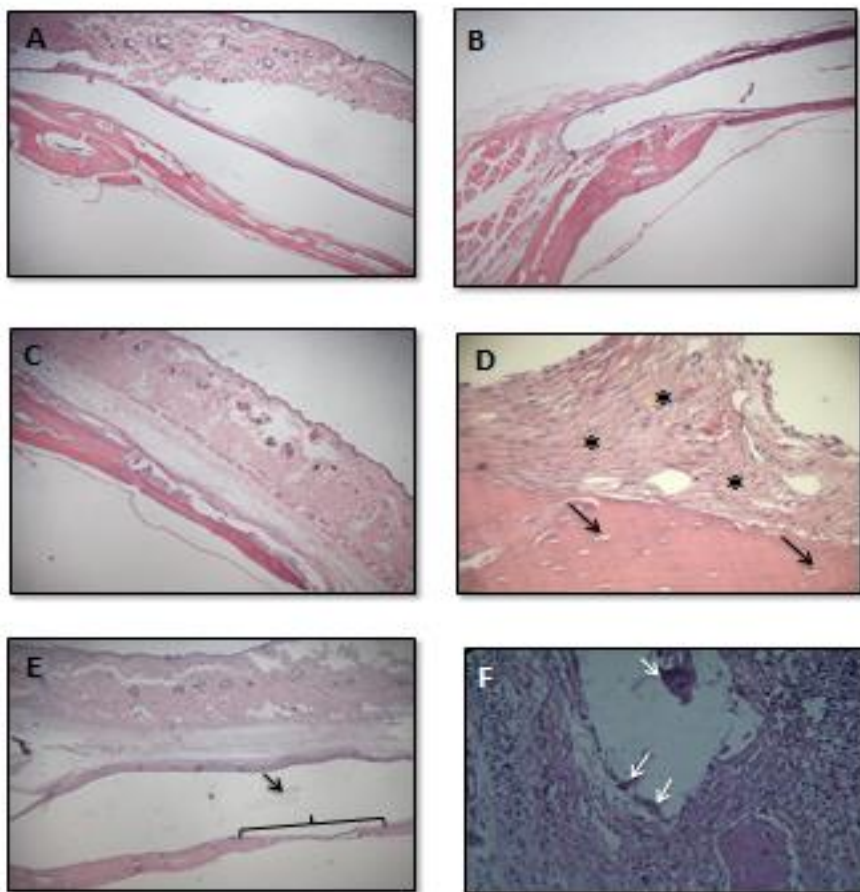


Figura 4 - Cortes histológicos em maiores e menores aumentos.

A - Histologia representativa do grupo PLGA+HA (aumento 40X); **B** - Histologia representativa do grupo PLGA (aumento: 40X); **C** - Histologia

representativa do grupo controle (aumento de: 40X); **D** - Corte histológico de amostra do grupo PLGA+HA mostrando a presença de tecido ósseo imaturo, observar as lacunas osteocíticas preenchidas por osteócitos (setas) e a deposição de fibras colágenas (asteriscos) (aumento 100X) ; **E** - Corte histológico mostrando a presença de deposição de fibras colágenas na região central do defeito em amostras de PLGA+HA (colchete). Material amorfo representando a membrana (seta) (aumento 40X); **F** - Corte histológico mostrando a presença de células gigantes multinucleadas (seta) (aumento 400X);

5.2 Quantificação da Área de Neoformação Óssea

Em relação ao percentual da quantidade óssea neoformada, o controle negativo apresentou o maior valor de área com 18,7%, seguido do grupo PLGA+HA e PLGA com 18,35 e 14,7% respectivamente (Gráfico 1). Porém não houve diferença estatística significativa entre eles.

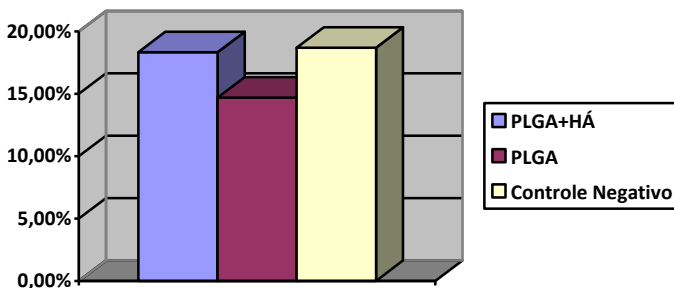


Gráfico 1- Porcetagem da área de tecido ósseo neoformado correspondente a cada grupo da amostra.

O teste de Shapiro-Wilk mostrou uma distribuição normal da amostra, para verificar a homogeneidade das variâncias foi o teste de Levene que foi aceito.

O controle negativo apresentou uma média de $4472823,33 \pm$ com um desvio padrão de 2981606,58, o grupo PLGA+HA apresentou uma média de área de $5936871,00 \pm$ e um desvio padrão de 3147235,01, enquanto que o grupo PLGA apresentou uma média de $3658131,60 \pm$ com um desvio padrão de 3484787,33.

ANOVA que mostrou não existir essa diferença nas médias. O nível de significância adotado foi $\alpha < 0,05$. O Valor de p encontrado foi de 0,541

Análise da morfometria óssea após 60 dias

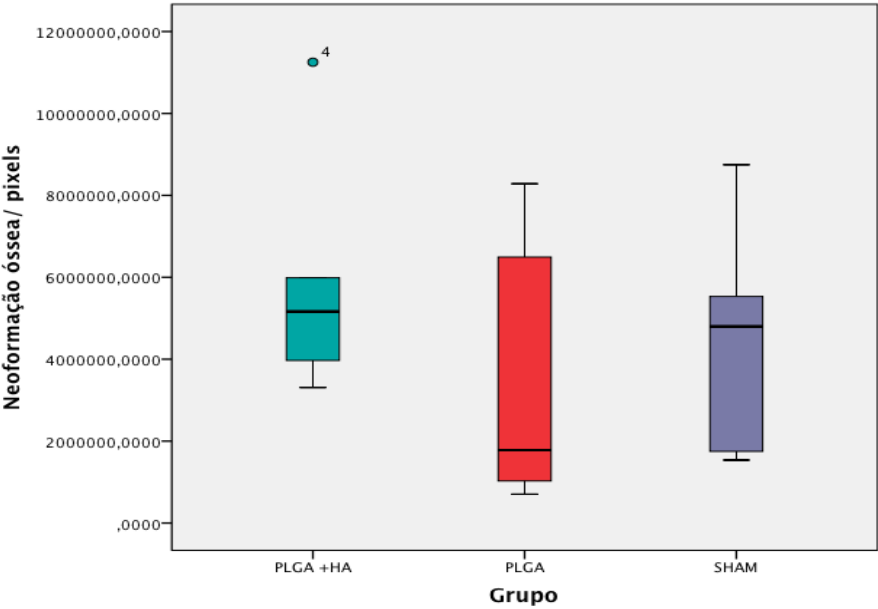


Gráfico 2 - Comparação da área em *pixels* entre os grupos PLGA+HA, PLGA e controle negativo após o período de 60 dias. Não houve diferença estatística entre os três grupos.

6. DISCUSSÃO

A utilização de membranas associadas aos procedimentos regenerativos do tecido ósseo tem permitido a possibilidade de restituição anatomorfofuncional idêntica deste tecido e possibilitando uma reabilitação estética e funcional previsível nas áreas com insuficiente quantidade óssea necessária para colocação dos implantes dentários. (HERMANN & BUSER, 1996; CHIAPASCO *et al.*, 2009).

Este estudo objetivou avaliar a neoformação óssea em defeitos realizados em calota craniana, recoberta por membranas de PLGA e PLGA+HA após um período de 60 dias. Tendo em vista o potencial osteopromotor da HA.

No trabalho de Notodihardjo *et. al* (2012) foi avaliado o efeito da combinação de proteína óssea morfogenética (BMP) e HA aplicado a defeitos de tamanho crítico criados na calota craniana de ratos. Foram utilizados vinte ratos divididos em quatro grupos - BMP+HA, HA, BMP e grupo controle. As amostras foram avaliadas histologicamente e radiograficamente quatro semanas após a cirurgia.

Na avaliação histológica, foi observada uma maior taxa de osteogênese no grupo BMP+HA, seguida do grupo BMP, e então HA e grupo controle. Na análise radiográfica, o grupo que apresentou maior radiopacidade foi BMP+HA, seguido dos grupos HA, e então BMP e grupo controle, mostrando que a HA representa papel carreador de indutores de crescimento ósseo.

Esse trabalho não apresentou uma diferença estatística significativa na comparação dos grupos testes quando comparados ao controle, ou aos

grupos testes entre si, porém a associação da HA a indutores ósseos tem mostrado efeitos positivos na indução da osteogênese em defeitos ósseos.

Não foi observado processo inflamatório exacerbado, sugerindo uma segurança em relação ao uso das membranas a base de PLGA, corroborando com os resultados satisfatórios obtidos *in vitro* no trabalho realizado por Ignatius & Claes (1996).

Uma das principais propriedades das membranas utilizadas em ROG é a estabilização do coágulo. Estudos mostram que a associação com enxertos ósseos podem permitir uma maior formação óssea (BUSER 2010; HERCULANI *et al.* 2000)

No trabalho de Herculani *et al.* (2000) onde foi avaliado *in vivo* o reparo ósseo associado ao uso de membrana recobrimdo o coágulo e, associado a membrana um substituto ósseo preenchendo o defeito, observou-se que houve uma maior formação óssea no grupo em que foi associado ao uso da membrana algum substituto ósseo após um período de 6 meses. Entretanto nenhum dos grupos apresentou o fechamento completo do defeito. Sendo assim pode-se supor que a utilização de substitutos ósseos para o preenchimento de defeitos ósseos pode evitar que ocorra o colapamento da membrana ou permitir que a membrana ocupe o espaço do coágulo, proporcionando uma menor formação óssea.

Em duas amostras dos grupos teste não foram observadas a membrana, acredita-se que tenha sido perdida durante o processamento histotécnico, tendo em vista que o material passa por processo de agitação.

Os resquícios de material amorfo recobrimdo os defeitos dos grupos teste são compatíveis com o processo de degradação das membranas, que se torna acelerado pelos produtos solventes utilizados durante o processamento histológico (xilol e álcool).

Este estudo apresentou algumas limitações, como a impossibilidade de uma imagem panorâmica da lâmina histológica para realização da morfometria, o que pode ter comprometido as áreas iniciais e finais da neofomação óssea durante a mensuração.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo não foi possível estabelecer significância no processo de neoformação óssea entre os grupos da pesquisa.

Uma amostra mais representativa poderá revelar ou não o efeito osseoindutor associado a HA. Bem com a associação a análises imunohistoquímica de proteínas ósseas como a osteonectina, osteopontina e fosfatase alcalina.

REFERÊNCIAS

BRÅNEMARK, P. I; BREINE, U; ADELL, R; HANSSON, B. O; LINDSTRÖM, J. O. Intra-Osseous Anchorage of Dental Prostheses: I. Experimental Studies. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, v.3, n.2, p.81–100, Jan, 1969.

ADELL R; ERIKSSON, B; LEKHOLM, U; BRÅNEMARK, P. I; JEMT, T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implant**, v.5, n.4, p.347–59, 1990.

LAMBRECHT, J. T; FILIPPI, A; KÜNZEL, A. R; SCHIEL, H. J. Long-term evaluation of submerged and nonsubmerged ITI solid-screw titanium implants: a 10-year life table analysis of 468 implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.18, n.6, p.826–34, Dec, 2003.

ARAÚJO, M. G; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v.32, n.2, p.212–8, Feb, 2005.

NYMAN, S; GOTTLÖW, J; KARRING, T; LINDHE, J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **Journal Clinical Periodontology**, v.9, n.3, p.257–65, Jun, 1982a.

MELCHER, A. H. On the repair potential of periodontal tissues. **Periodontal Repair**, v.47, n.5, p.256–60, May, 1976.

KARRING, T; NYMAN, S; LINDHE J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. **Journal Clinical Periodontology**, v.7, n.2, p.96–105, Apr, 1980.

NYMAN, S; LINDHE, J; KARRING, T; RYLANDER, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **Journal Clinical Periodontology**, v.9, n.4, p.290–6, Aug, 1982b.

DAHLIN, C; LINDE, A; GOTTLOW, J; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg**, v. 81, n.5, p.672-6, May, 1988.

DAHLIN, C; LINDE, A. Membrane-Introduced Bone Augmentation at Titanium Implants. A Report on Ten Fixtures Followed From 1 to 3 Years After Loading. v.11, n.4, p.273–81, 1991.

NYMAN S. NIKLAUS P. L; BUSER, D; BRÄGGER, U. Bone Regeneration Adjacent to Titanium Dental Implants Using Guided Tissue Regeneration: A Report of Two Cases. **JOMI**, p-9-14, Jan, 1990.

BUSER, D. 20 anos de Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia. São Paulo: **Quintessence**; 276 p. 2010

JUNG, R. E; KOKOVIC, V; JURISIC, M; YAMAN, D; SUBRAMANI, K; WEBER, F. E. Guided bone regeneration with a synthetic biodegradable membrane: a comparative study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v.22, n.8, p.802–7, Aug, 2011.

JUNG, R. E; FENNER, N; HÄMMERLE, C. H. F; ZITZMANN, N. U; Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. **Clin Oral Implants Res**, v.24, n.10, p.1065–73, Oct, 2013.

SCHNEIDER, D; WEBER, F. E; GRUNDER, U; ANDREONI, C; BURKHARDT, R; JUNG, R. E. A randomized controlled clinical multicenter trial comparing the clinical and histological performance of a new, modified polylactide-co-glycolide acid membrane to an expanded polytetrafluoroethylene membrane in guided bone regeneration procedures. **Clin Oral Implants Res**, v.25, n.2, p.150–8, Feb, 2014.

LEE, S. B; KWON, J. S; LEE, Y. K; KIM, K. M; KIM, K. N. Bioactivity and mechanical properties of collagen composite membranes reinforced by chitosan and β -tricalcium phosphate. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.100, n.7, p.1935–42, Oct, 2012.

CHEN, G; XIA, Y; LU, X; ZHOU, X; ZHANG, F; GU, N. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research** , v.101A, n.1, p.44–53, Jan, 2013.

HAO, J; ACHARYA, A; CHEN, K; CHOU, J; KASUGAI, S; LANG, N. P. Novel bioresorbable strontium hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, Oct, 2013.

FILHO, H. N; JÚNIOR, L. C; NAGEM, H. D; FRANCISCONI, P. A. S. Scaffolds in tissue engineering bone. **Novations implant journal - biomaterials and esthetics**, v.01, n.01, p.54–62, Maio, 2006.

COSTA, A. C. F. M; LIMA M. G; LIMA, L. H. M. A; CORDEIRO V, V; VIANA, K. M. S; SOUZA, C. V; LIRA, H. L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.4, n.3, p.29–38, 2009.

HÄMMERLE, C. H; JUNG, R. E; Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontol** **2000**, v.33, p.36-53, 2003.

DANHIER, F; ANSORENA, E; SILVA, J. M; COCO, R; LE BRETON, A; PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **J Control Release**, v.161, n.2, p.505-22, Jul, 2012.

FINN, G. **Histologia com bases biomoleculares**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. 632 p.

GARTNER, L. P; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. 3rd ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2007.

ROSS; MICHAEL H; REITH, E. J; ROMRELL, L. J. **Histologia: texto e atlas**. 2nd ed. São Paulo (SP): Panamericana; 1993. 779 p.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2003.

RUBIN, E. G. F; SCHWARTING, R; RUBIN, R; STRAYER, D. **Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. 1625 p.

MURRAY, G; HOLDEN, R; ROSCHLAU, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. **Am J Surg**, v.93, n.3, p.385–7, Mar, 1957.

BUSER, D; DULA, K; HESS, D; HIRT, H. P; BELSER, U. C. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. **Periodontol**, v.19, n.1, p.151–63, Feb, 1999.

HERMANN, J. S; BUSER, D. Guided bone regeneration for dental implants. **Curr Opin Periodontol**, v.3, p.168–77, 1996.

SCHROEDER, H. E. The periodontium, **Handbook of Microscopic Anatomy**, Berlin, v.5, p.233-313, 1986.

CHIAPASCO, M; CASENTINI, P; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.24, p.237–59, 2009.

SIMION, M; JOVANOVIC, S. A; TINTI, C; BENFENATI, S. P. Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up. **Clin Oral Implants Res**, v.12, n.1, p.35–45, Feb, 2001.

BLANCO, J; ALONSO, A; SANZ, M. Long-term results and survival rate of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year case series prospective study. **Clinical Oral Implants Research**, v.16, n.3, p.294–301, Jun, 2005.

BUNYARATAVEJ, P; WANG, H. L. Collagen membranes: a review. **J ournal Periodontology**, v.72, n.2, p.215–29, Feb, 2001.

ROTHAMEL, D; SCHWARZ, F; SCULEAN, A; HERTEN, M; SCHERBAUM, W; BECKER J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. **Clinical Oral Implants Research**, v.15, n.4, p.443–9, Aug, 2004.

OWEN, R. G; JACKSON, J. K; CHEHROUDI, B; BRUNETTE, M. D; BURT, M . H. An in vitro study of plasticized poly(lactic-co-glycolic acid)films as possible guided tissue regeneration membranes:Material properties and drug release kinetics. **Journal of Biomedical Materials Research Part**, v.95A, n.3, p.857–869, Dec, 2010.

NOTODIHARDJO, F. Z; KAKUDO, N; KUSHIDA, S; SUZUKI, K; KUSUMOTO, K. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. **J Cranio-Maxillofac Surg**, v.40, n.3, p.287–91, Apr, 2012.

IGNATIUS, A. A; CLAES, L. X. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(P-L-lactide) and poly(L-lactide-coglycolide). **Biomaterials**, v 17, p.631-639, 1996.

ANEXO**Anexo A – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais – CEPA****Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00831

Título

Análise do padrão de regeneração óssea guiada, utilizando membranas de ácido polilático co-glicólico (PLGA) associado ou não à hidroxiapatita (PLGA + HA) em defeitos ósseos na calota craniana de ratos.

Data de Entrada

02/05/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

16/08/2013

Considerações

Ofício nº 81/CEUA/PROPEQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ricardo de Souza Magini, Departamento de Odontologia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de cinquenta ratos (*Rattus Norvegicus*).

- Procedência do animal: Biotério Central - UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 20/11/2015**

Data 20/08/2013

Parecer(es):

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**

|

